

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

UREĐIVANJE RNA

RNA EDITING

SEMINARSKI RAD

Tihana Marić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr.sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2015.

Sadržaj

1. UVOD	2
2. SUPSTITUCIJSKA UREĐIVANJA RNA U JEZGRI SISAVACA.....	3
2.1 OBITELJ APOBEC.....	3
2.1.1 Uređivanje mRNA kompleksom APOBEC1	5
2.1.2 Uređivanje mRNA proteinom APOBEC3A	6
2.2 ADENOZINSKE DEAMINAZE SPRECIFIČNE ZA RNA	7
2.2.1 Z-DNA vezujuća domena proteina ADAR1	8
2.2.2. Protein ADAR2.....	10
2.2.3 Protein ADAR3.....	12
3. UREĐIVANJE MITOHONDRIJSKE RNA KOD PRAŽIVOTINJA.....	13
3.1 UREĐIVANJE MITOHONDRIJSKE MRNA KINETOPLASTIDA.....	13
3.1.1 Osnovni mehanizam uređivanja RNA	13
4. UREĐIVANJE MITOHONDRIJSKE TRNA KOD AMEBE <i>ACHANTOAMOEBA</i>	15
5. UREĐIVANJA RNA KOD BILJAKA	16
6. UREĐIVANJE RNA KOD VIRUSA	17
7. MODEL NEUTRALNE KONSTRUKTIVNE EVOLUCIJEERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
8. LITERATURA.....	19
SAŽETAK.....	22
SUMMARY	23

1. Uvod

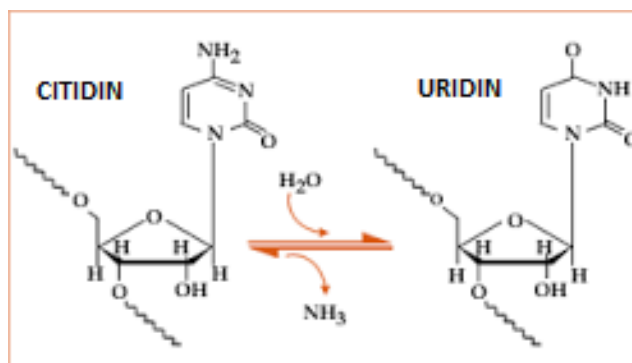
Uređivanje RNA (engl. *RNA editing*) opisuje molekularne procese koji uključuju post-transkripcijsku promjenu nukleotida RNA molekule u odnosu na kodirajuću DNA te je često nužno za uspostavljanje biološke funkcije molekula. Pojam uređivanje RNA ne podrazumijeva izrezivanje introna, stavljanje kape na 5'-kraj niti dodavanje višestrukih adenoza 3'-kraja mRNA. Odvija se u eukariotskim organelima koji sadrže kodirajuću DNA: u jezgri kod životinja, u mitohondrijima životinja, biljaka i praživotinja te u plastidima kopnenih biljaka. Također je pronađeno kod određenih skupina RNA-virusa kao što su Ebolavirus, virus hepatitisa delta, Newcastle zarazni virus, itd. (Brennicke *et al.*, 1998.). U prokariotskim organizmima zasad nije promatran proces uređivanja RNA, iako je u novijim istraživanjima opisano uređivanje kod arheja (Gray, 2012.). Molekule RNA koje podliježu uređivanju nisu samo RNA koje kodiraju proteine tj. mRNA, već i nekodirajuće RNA kao što su rRNA, tRNA te miRNA, srRNA, duga nekodirajuća RNA (Nigita *et al.*, 2015.). Mehanizmi uređivanja RNA su različiti kod pojedinih vrsta, no možemo ih obuhvatiti u dvije glavne skupine koje opisuju krajnji rezultat uređivanja, supstitucije i delecije/insercije (Gray, 2012.). Supstitucije se odnose na zamjenu postojećeg nukleotida drugim procesom deaminacije, a najčešće dolazi do deaminacije C→U te A→I. Manje zastupljene promjene jesu zamjene U→C, G→A i U→A. Kod supstitucija se ne mijenja broj nukleotida. Kod delecija tj. insercija dolazi do pucanja ili stvaranja fosfodiesterske veze što rezultira promijenjenim brojem nukleotida (Brennicke *et al.*, 2012.). Najizučavaniji primjer, ujedno i onaj zbog kojega je uveden naziv „uređivanje RNA“, jest post-transkripcijska insercija, rjeđe delecija, uridina kod mitohondrijske mRNA praživotinja razreda kinetoplastida (Stuart *et al.*, 2005.). Naposljetku, uređivanje RNA ima mjesnu filogenetičku raspodjelu tj. određeni mehanizam svojstven je skupini organizama te je isti mehanizam rijetko nađen kod različitih skupina. Ta činjenica upućuje kako sustav uređivanja nije naslijeđen od zajedničkog pretka, već je evolucijski mlađe usvojeno svojstvo pojedinih razvojnih linija (Gray, 2012.).

2. Supstitucijska uređivanja RNA u jezgri sisavaca

Novija istraživanja kazuju o sve većoj prisutnosti uređivanja RNA kod raznih životinjskih organizama. Ipak, nekoliko njih je detaljnije okarakterizirano. U jezgri se odvija manjinski broj uređivanja te su najbolje proučeni primjeri kod sisavaca promjena C→U pomoću enzimskog sustava APOBEC, te A→I pomoću enzima obitelji ADAR (Gray, 2012.). To su i jedini poznati sustavi uređivanja RNA kod sisavaca.

2.1 Obitelj APOBEC

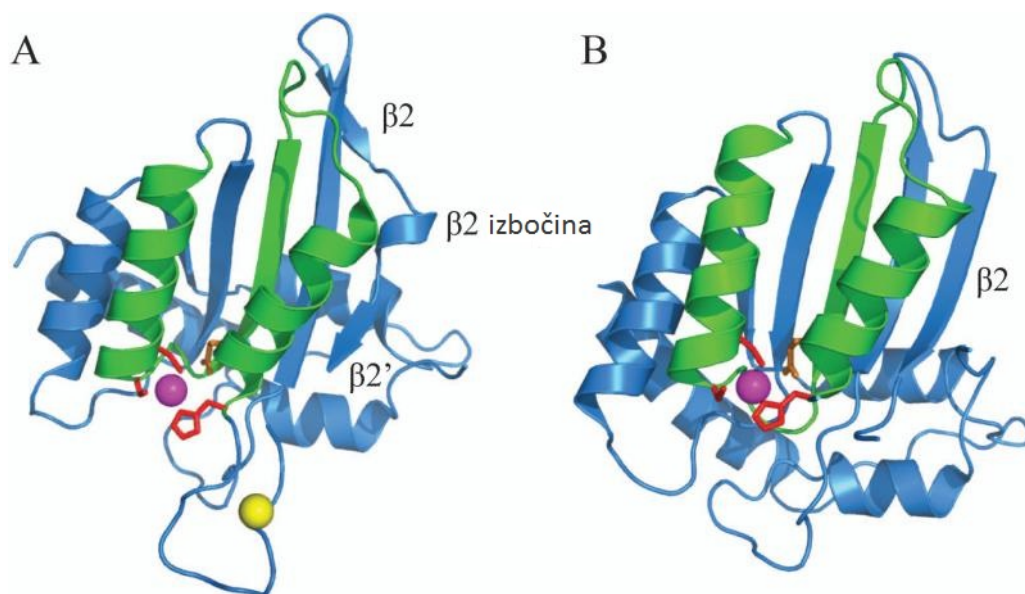
Kompleks za uređivanje mRNA apolipoproteina B, skraćeno APOBEC, je obitelj citidinskih deaminaza koje deaminiraju citidin (C) u uridin (U) (Slika 1).



Slika 1. Deaminacija C→U. Voda nukleofilno napada amino skupinu na C4 položaju citidina. (http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/splicing/rna_editing.html)

Obitelj je dobila ime prema prvom otkrivenom članu, proteinu APOBEC 1 (engl. *apolipoprotein B mRNA editing catalytic subunit 1*), koji uređuje mRNA za apolipoprotein B. Inače obitelj APOBEC uključuje veću skupinu enzima koji sudjeluju u procesu uređivanja RNA, u određenim uvjetima i jednolančane DNA. Također iako naziv obitelji je prema apolipoproteinu B, on je supstrat samo za enzim APOBEC1. Obitelj APOBEC ispada pod super obitelj citidinskih deaminaza (engl. *cytidine deaminase*, CDA) koja još uključuje i obitelj ADAR te obitelj ADAT (detaljnije u poglavlju 2.2). Svi pripadnici super obitelji CDA imaju deaminaznu domenu ovisnu o cinku (engl. *zinc-dependent deaminase domain*, ZDD). Prepoznaje se karakterističnim primarnim motivom aminokiselina te očuvanom sekundarnom strukturom (Slika 2.) (Smith *et al.*, 2011.). Ion cinka u aktivnom mjestu je koordiniran sa tri cisteinska ili histidinska aminokiselinska ostatka gdje sudjeluje u reakciji (Prohaska *et al.*, 2014.). Mehanizam deaminacije obitelji APOBEC djeluje na očuvanom principu. Odvija se

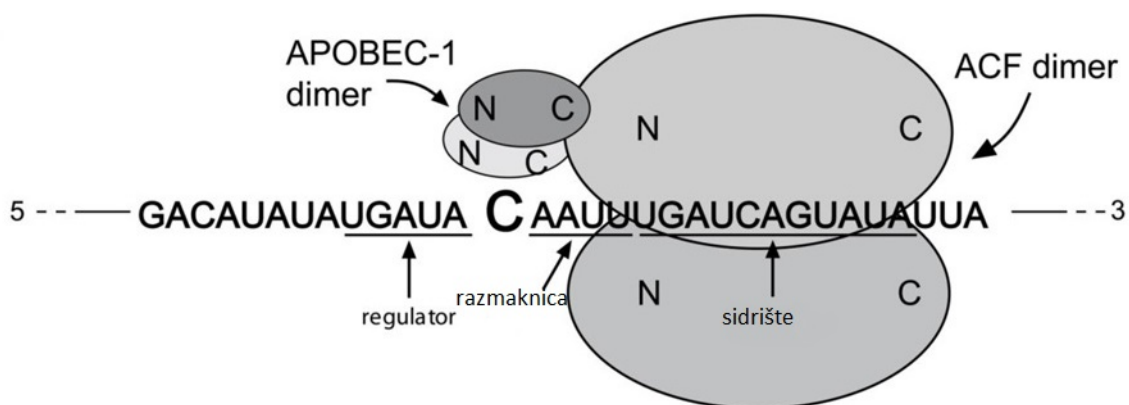
nukleofilnim napadom hidroksilne skupine vode koja sudjeluje u reakciji na amin na C4 položaju pirimidinskog prstena te iz citidina ili deoksicitidina nastaje uridin tj. deoksiuridin (Slika 1.). Očuvani glutamatni ostatak djeluje kao izmjenjivač protona tijekom reakcije dok prolinski ostatak, također konzerviran, određuje orijentaciju susjednih katalitičkih skupina. Regulacija obitelji APOBEC enzima odvija se na više razina uključujući razvoju, hormonalnu i metaboličku regulaciju ekspresije APOBEC gena, odjeljivanje enzima APOBEC unutar stanice, vezanja kofaktora te degradacije samih proteina (Prohaska *et al.*, 2014.). U APOBEC obitelj spadaju slijedeći enzimi: APOBEC1, APOBEC2, skupina proteina APOBEC3(A-H), APOBEC4 te AID. (Smith *et al.*). APOBEC1 i APOBEC3 sudjeluju u uređivanju RNA i koriste mRNA kao supstrat, što će biti detaljnije opisana u nastavku. APOBEC2 se eksprimira u mišićnom i srčanom tkivu, no nema zasad poznatu funkciju, kao niti APOBEC4 (Smith *et al.*, 2011.). Aktivacijom inducirana deaminaza (engl. *activation-induced (cytidine) deaminase*, AID) djeluje na jednolančanu DNA u regiji imunoglobulinskih lokusa limfocita B (Prohaska *et al.*, 2014.).



Slika 1. Reprezentativna kristalna struktura ZDD domene obitelji APOBEC na temelju enzima skupine APOBEC3. Različiti Z tipovi označavaju skupine ZDD motiva razdijeljenih prema srodnošću te strukturalnim i funkcijskim sličnostima. **a)** Z-1 tip APOBEC3G i **b)** Z-2 tip APOBEC3F. Supersekundarni $\alpha\beta$ -strukturni element (zeleno) nalazi se u unutrašnjosti enzima. Oko njega su β ploče okružene sa 6 α -zavojnica. Ljubičasta kuglica označava katalitički ion cinka, crveno su označeni aminokiselinski ostaci kojima je koordiniran. Narančastom je označena glutaminska kiselina koja sudjeluje u prebacivanju protona. Kod A3G se nalazi cinkov ion (žuto) koji ne sudjeluje u katalitičkoj reakciji, najvjerojatnije artefakt nastao prilikom kristalizacije (Prohaska *et al.*, 2014.).

2.1.1 Uređivanje mRNA kompleksom APOBEC1

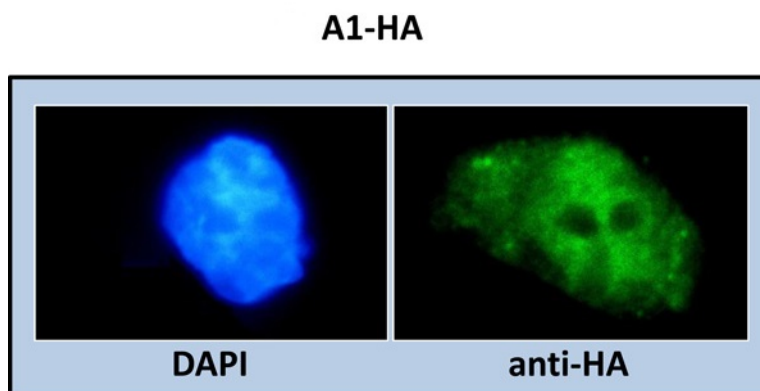
APOBEC1 (A1) je prvi identificirani enzim obitelji APOBEC. Vršiti deaminaciju mRNA za apolipoprotein B na 6666. nukleotidu, gdje uzrokuje promjenu CAA (glutamin)→UAA (preuranjeni stop kodon) (Smith *et al.*, 2011.). Tu funkciju protein APOBEC1 vrši u tankom crijevu ljudi i jetri glodavaca (Saraconi *et al.*, 2014.). Gen za apolipoprotein B kodira dvije varijante proteina – APOB100 i APOB48. APOB100 se sintetizira u jetri odakle se luči u plazmu, dok se APOB48 sintetizira u tankom crijevu. Oba proteina se nalaze kao sastavne komponente LDL čestica koje sudjeluju u prijenosu masnih kiselina i kolesterola u krvnoj plazmi (Gray, 2012.). Protein APOBEC1 niskim afinitetom veže RNA te mu je za uređivanje potreban APOBEC1 komplementacijski faktor (engl. *APOBEC1 complementation factor*, ACF). Protein ACF na *apoB* mRNA prepoznaje specifični vezujući slijed s čije 5'-strane se nalazi citidin predodređen za deaminaciju (Slika 3.).



Slika 3. Model kompleksa A1 sa apoB mRNA supstratom. Motiv predodređen za uređivanje sastoji se od sidrišne sekvence, razmaknice na 3'-strani od C predodređenog za deaminaciju te regulatora na 5'-strani. A1 tvori dimer te C-krajem stupa u interakciju sa N-krajem ACF dimera (Smith *et al.*, 2011.).

Proces deaminacije proteinom A1 se regulira na više razina. Uređena i neuređena mRNA za apoB nalaze se u različitim omjerima u stanicama koje ih ekspimiraju no ukoliko A1 nije prisutan u jezgri neće doći do uređivanja. Interakcija A1 i ACF je također bitan čimbenik kao i odjeljivanje kompleksa A1-ACF u različite stanične odjeljke (Smith *et al.*, 2011.). Određivanjem lokalizacije proteina APOBEC (Slika 4.) ustvrđena je njegova prisutnost u jezgri i u citoplazmi. Sedimentacijom u gradijentu gustoće glicerola, iz ekstrakta jezgre, dobiven je 27S kompleks A1 i ACF koji je aktivni oblik. Sedimentacijom ekstrakta citoplazme dobiven 60S kompleks inače neaktivan. Prebacivanjem citoplazmatskog

kompleksa u jezgri regenerira se ponovno aktivan 27S kompleks (Smith *et al.*, 2011.). Prema tome ovisno o staničnom odjeljku u kojemu se nalaze A1 i ACF, biti će različito organizirani u kompleks što će odrediti hoće li biti aktivni ili neće.



Slika 4. Lokalizacija A1 sa C-terminalnim HA tagom *in situ* fluorescencijom. A1 lokaliziran u citoplazmi i jezgri, ali ne i u nukleolusu (Smith *et al.*, 2011.).

Osim u gastrointestinalnom traktu, ekspresija enzima APOBEC1 utvrđena je u uzorcima tumora perifernih živčanih ovojnica kod pacijenata sa neurofibromatozom tipa 1. Inaktivni neurofibromin (NF1), tumor supresorski genski produkt *NF1* gena, pronađen je kod prethodno spomenutih pacijenata. Gubitak funkcije NF1 može uzrokovati proces uređivanja deaminacijom CGA (arginin) u UGA (preuranjeni stop kodon) što stvara krnji protein (Mukhopadhyay *et al.*, 2001.).

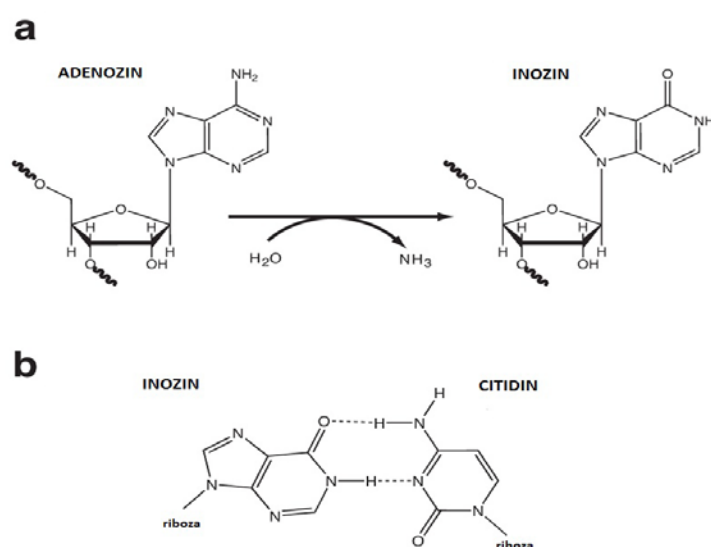
2.1.2 Uređivanje mRNA proteinom APOBEC3A

Skupini enzima APOBEC3 (A3) pripada osam članova (A3A-A3H). Kao supstrat deaminiraju deoksicitidin na jednolančanoj DNA (Smith *et al.*, 2011.). Njihova dobro poznata uloga je obrana od retrovirusa i retroelemenata deaminacijom strane DNA (Koito i Ikeda., 2011.). U transkriptima gena za sukcinat dehidrogenaze B (SDHB), u perifernim monojezgrenim krvnim stanicama (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) čovjeka, dolazi do uređivanja C→U prilikom kojega nastaje *nonsense* promjena (R46X). SDHB je inače podjedinica respiratornog lanca u mitohondrijima koja sudjeluje u odgovoru na promjene kisika u stanici. Opisanu deaminaciju vrši protein APOBEC3A. To je drugi enzim obitelji APOBEC, nakon otkrića APOBEC1, koji sudjeluje u uređivanju RNA. Analizom transkriptoma PBMC sa većim udjelom monocita (Sharma *et al.*, 2015.) potvrđeno je da APOBEC3A sudjeluje u uređivanju RNA stanica monocita i makrofaga. Prilikom hipoksije,

fenomena nedostatka kisika u stanicama, i prisutnosti IFN-a (interferona) ili prisutstvom signalnih proteina koje otpuštaju tumorske stanice ili stanice zaražene najčešće virusima, učestalost uređivanja SDHB RNA se povećava. Stoga protein APOBEC3A ima ulogu u imunološkom odgovoru organizma.

2.2 Adenozinske deaminaze specifične za RNA

Enzimska obitelj ADAR (engl. *adenosine deaminase acting on RNA*) vrši deaminaciju A→I na dvolančanoj RNA (dlRNA), kodirajućoj i ne kodirajućoj. Inozin (I) se tijekom translacije čita kao gvanozin (G) te se sparuje sa citozinom (C) što dovodi do različitog čitanja transkripta od onog zapisanog u genomu (Slika 5.) (Barraud i Allain, 2012.). Geni koji kodiraju enzime ADAR su konzervirani stoga se mogu naći kroz cijelo carstvo životinja dok kod biljaka, gljiva i praživotinja nisu pronađeni (Nishikura, 2010.). Sadrže C-terminalnu katalitičku deaminaznu domenu te jednu do tri N-terminalne vezujuće domene za dlRNA (engl. *dsRNA binding domain*, dsRBD) (Jepson i Reenan, 2008.). Pretpostavlja se je obitelj ADAR nastala od adenozinskih deaminaza specifičnih za molekule tRNA (engl. *adenosine deaminase acting on tRNA*, ADAT) zbog homologije pronađene među deaminaznim katalitičkim podjedinicama. Ugradnjom regije koja kodira za dlRNA vezujuće domene u gena za ADAT te daljnjim duplikacijama ancestralnog gena ADAR su formirani suvremeni enzimi ADAR (Grice i Degnan 2015.). Također je pronađena homologija s obitelji enzima APOBEC te zajedno pripadaju super obitelji CDA (Prohaska *et al.*, 2014.).



Slika 5. A) Hidrolitička deaminacija A→I. B) I se sparuje sa C te se u većini procesa čita kao G (Barraud i Allain, 2012.).

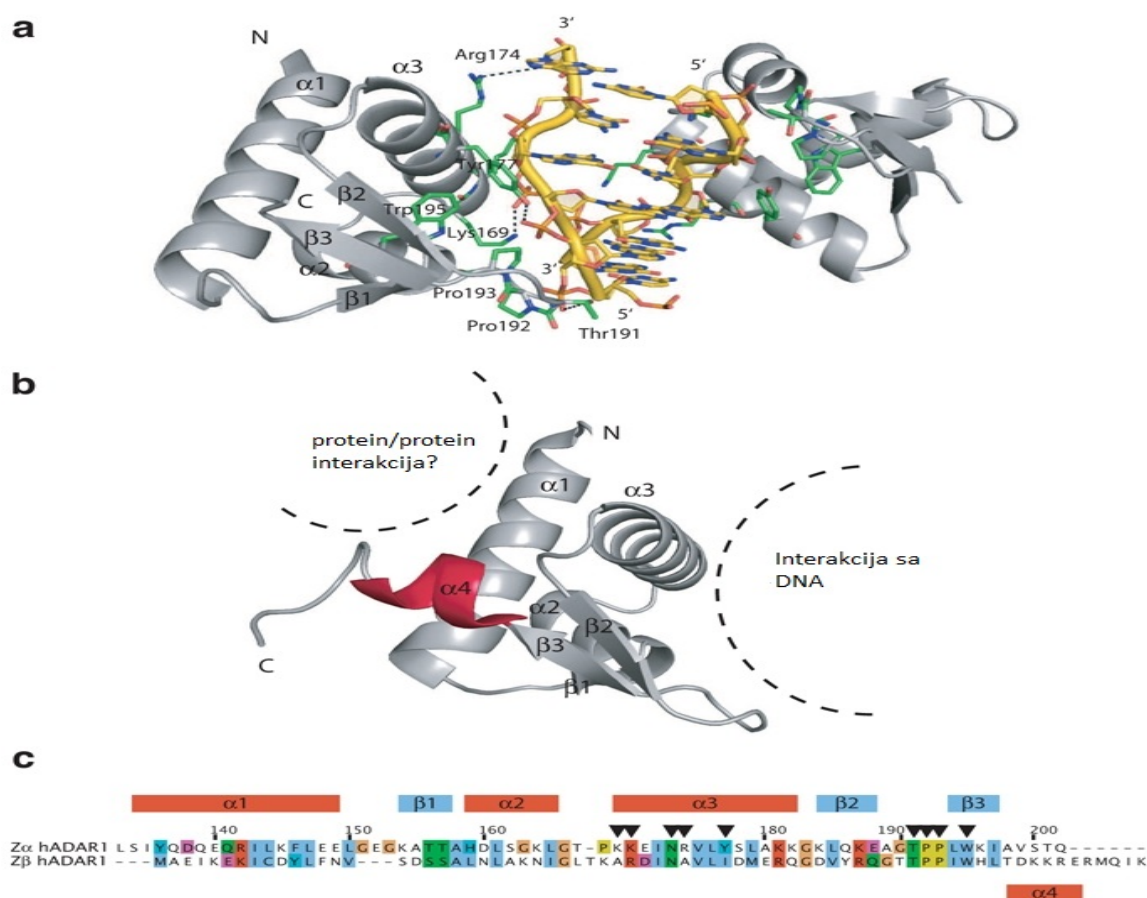
Uređivanje RNA enzimskim sustavom ADAR smatra se dominantnim sustavom uređivanja kod sisavaca. Kod ljudi nalazimo tri različita enzima – ADAR1 i ADAR2, koji se eksprimiraju u raznim tkivima te ADAR3 specifičan za živčano tkivo mozga (Nigita *et al.*, 2015.).

Supstrat za ADAR može biti bilo koja dlRNA veća od 20 baznih parova. Aktivnost enzima ADAR se može razmotriti kao specifična za supstrat i nespecifična za supstrat. Precizno sparjene duge regije dlRNA mogu biti nespecifično deaminirane. Mogu nastati sparivanjem Alu elemenata, transpozona ili virusne RNA. S druge strane, kraće ili duže, neprecizno sparjene dlRNA mogu biti uređene na specifičnim A bazama što je zamijećeno kod pre-mRNA kodirajućih regija neuralnih transkripta kao što je podjedinica B receptora za glutamat (GluR-B) te serotonininski 2C receptor (5HT-_{2C}R) kod sisavaca (Jepson i Reenan, 2008.). Neprecizno sparivanje se formira između eksona koji okružuje mjesta uređivanja i najčešće intronskog komplementarnog slijeda nazvanog slijed koji je komplementaran mjestu uređivanja (engl. *editing-site complementary sequence*, ESC) (Nishikura, 2010.). Mjesta uređivanja dlRNA sustavom ADAR često su nekodirajući sljedovi. Prije spomenuti Alu elementi, kratki, ponavljajući DNA elementi dužine oko 280 bp koji pripadaju obitelji kratkih mjestimičnih nuklearnih elemenata (engl. *short interspersed nuclear elements*, SINEs), dugi mjestimični nuklearni elementi (engl. *long interspersed nuclear elements*, LINEs) su česte mete A→I uređivanja (Jepson i Reenan, 2008.). Prekursori nekih mikro RNA (miRNA) tijekom sazrijevanja prolaze proces uređivanja ili uređivanjem mijenjaju ciljani gen na koji djeluju te enzimi ADAR mogu djelovati inhibicijski na kratke interferirajuće RNA (engl. *short interfering RNA*, siRNA). Uređivanje sustavom ADAR stupa u interakcije sa interferencijskim RNA putovima. To su putovi stižavanja ekspresije gena uništavanjem mRNA gdje glavnu ulogu imaju miRNA i siRNA. Stoga utjecaj proteina ADAR poprima puno šire granice nego što bi uređivanjem isključivo kodirajućih molekula RNA (Nishikura, 2010.).

2.2.1 Z-DNA vezujuća domena proteina ADAR1

Protein ADAR1 je prvi otkriveni član enzimske obitelji ADAR u ljudi. Najdetaljnije je karakteriziran protein koji stupa u interakciju sa Z oblikom DNA koja tvori lijevu uzvojnica, za razliku od desnih A i B oblika DNA (Lehninger, 2013.). Točnije, ADAR1 u stanici dolazi u dvije izoforme ADAR1-i, čiju ekspresiju induciraju interferoni (IFN), i ADAR1-c, manja

izoforma koja je konstitutivno eksprimirana. Oba imaju katalitičku deaminaznu domenu i tri vezujuće domene za dRNA. ADAR1-i sadrži na krajnjem N-terminalnom dijelu vezujuće domene za Z-DNA, domenu $Z\alpha$ koja stupa u interakciju sa Z-DNA i domenu $Z\beta$. Domena $Z\alpha$ (Slika 6.a) ima tri α -zavojnice ($\alpha1$ - $\alpha3$) te postrani tri antiparalelne β -ploče ($\beta1$ - $\beta3$). Stupa u interakciju samo sa jednim lancem Z-DNA preko $\alpha3$ -zavojnice i C-terminalne β -ukosnice (Slika 6.a, c). Aminokiselinski ostaci $\alpha3$ -zavojnice i β -ukosnice stvaraju polarne interakcije sa fosfolipidnom okosnicom što ukazuje na specifično prepoznavanje konformacije između supstrata od strane enzima ADAR1.



Slika 6. Struktura vezujuće domene za Z-DNA proteina ADAR. **a)** Struktura domene $Z\alpha$ proteina ADAR1 u interakciji sa Z-DNA (CG)₃ prikazuje kontakt između fosfatne okosnice i $\alpha1$ -zavojnice te $\beta2$ - i $\beta3$ -ukosnice. **b)** Struktura domene $Z\beta$ koja ne veže Z-DNA, već može stvoriti interakcije s proteinima. Crveno označen je dodatni $\alpha4$ -zavojnica. **c)** Sljedovi domena $Z\alpha$ i $Z\beta$ kod ljudi. Sekundarne strukture su navedene iznad sljedova, dodatni $\alpha4$ -zavojnice ispod. Crne strelice prikazuju aminokiselinske ostatke koji ostvaruju kontakt sa Z-DNA, od kojih neki nisu očuvani kod domene $Z\beta$ (Barraud i Allain, 2011.).

Domena $Z\alpha$, osim sa Z-DNA, može stupiti u interakciju i sa Z-RNA. Stvaranje Z oblika molekule RNA je povoljno kod naizmjenično poredanih purinskih i pirimidinskih sljedova, pogotovo gvanozina i citozina. Protein ADAR1-i favorizira interakcije sa Z-RNA te je

uređivanje učestalije u prisutnosti Z oblika što je ujedno i biološka uloga tog procesa. Domena Z β je prisutna kod obje izoforme proteina ADAR1, evolucijski je očuvana što ukazuje na moguću različitu funkciju od domene Z α . Sadrži $\alpha 4$ zavojnicu više nego Z α (Slika 6.b), no nedostaju aminokiselinski ostaci ključni za interakciju sa Z-DNA. Proteini ADAR poneka djeluju kao dimeri te je moguća uloga ove domene u protein/protein (Barraud i Allain, 2011.).

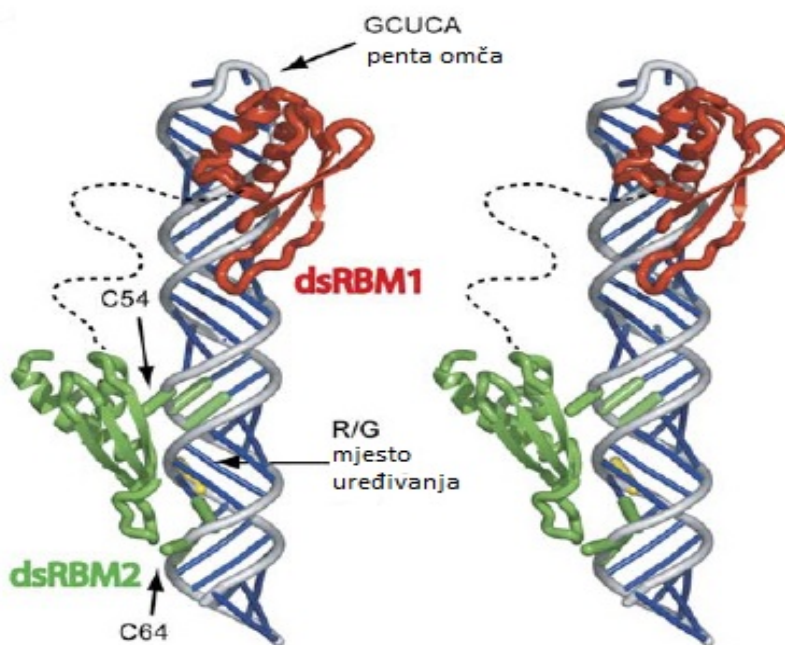
Nedavna studija (Bahn *et al.*, 2015.) ispitala je vezna mjesta ADAR1 u humanim stanicama koristeći metodu unakrsnog povezivanja spregnutog s imunoprecipitacijom (engl. *cross-linking immunoprecipitation*, CLIP) što je dovelo do zaključaka o funkciji proteina. Većina detektiranog proteina ADAR1 bila je vezana u regijama oko elemenata Alu u intronskim sljedovima, što potvrđuje regije Alu kao najčešće regije uređivanja A \rightarrow I. Protein ADAR1 prepoznaje supstrat zbog strukturne specifičnosti, a ne nukleotidnog slijeda. Također određeni dio proteina ADAR1 lociran je u regijama različitim od Alu, koje sadrže više eksona i neprevedenih regija (engl. *untranslated region*, UTR), te je manji dio otpao na LINEs i SINEs. Vezanje proteina ADAR1 na 3'-UTR može inducirati uređivanje, no ono nije neophodno te funkcionalna važnost tog procesa nije u potpunosti razjašnjena. Protein ADAR1 utječe i na sazrijevanje miRNA stupajući u interakciju sa primarnom (pri-) miRNA te pojačava njenu ekspresiju. Geni na koje zatim utječe miRNA imaju uloge u staničnim odgovorima na proliferaciju, rast, smrt stanice, oštećenje DNA i dr (Bahn *et al.*, 2015.).

2.2.2 Protein ADAR2

Poput proteina ADAR1, protein ADAR2 se konstitutivno eksprimira u većini tkiva no najobilnije u mozgu. Lokaliziran je većinom u jezgri. Kod određenih supstrata proteini ADAR1 i ADAR2 imaju preklapajuće djelovanje (Samuel, 2011.). Primjerice, oba enzima mogu djelovati na mRNA za B podjedinicu AMPA (engl. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*) podtipa receptora za glutamat (GluR-B) na mjestu R/G. Tu dolazi do promjene u slijedu AGA, za arginin (R), u IGA, za glicin (G). Mjesto Q/R, također na GluR-B, specifično je za enzimsko djelovanje proteina ADAR2 te dolazi do promjene iz glutamina (Q) u arginin (R) tj. slijeda CAG u slijed CIG. Glutamatni receptor je inače receptor kojeg aktivira glutamat, glavni prijenosnik pobudnih signala u mozgu. Uređivanjem mjesta Q/R, kanal je nepropusan za kalcij što je bitno za normalnu funkciju mozga (Wright i Vissel, 2012.). Također proteini ADAR1 i ADAR2 su potrebni za potpuno uređenje mRNA serotoniniskog receptora 5HT- $2C$ R (Samuel, 2011.). Transkript gena za ADAR2 prolazi kroz

proces izrezivanja što ukazuje na postojanje više izoformi. Izoforma ADAR2R sadrži visoko očuvanu R-domenu, bogatu pozitivno nabijenim aminokiselinским ostacima, sličnu R-domeni proteina ADAR3. To ukazuje na specifičnu očuvanu funkciju ovog enzima (Maas i Gommans, 2009.). Protein ADAR2 posjeduje specifičan mehanizam negativne autoregulacije očuvan kod čovjeka, miša i štakora. Može urediti vlastitu nezrelu mRNA tako da u intronskoj regiji deaminira A→I što dovodi do pojavljivanja mjesta, blizu 5' kraja, u koje se ubacuje slijed od 47 nukleotida kod čovjeka. To dovodi do preuranjenog zaustavljanja translacije te nefunkcionalnog proteina ADAR2. Svrha joj prikladan odgovor na promjene koncentracije supstrata za protein ADAR2 u stanici (Feng *et al.*, 2006.).

Protein ADAR2 sadrži dva vezujuća motiva za dsRNA (engl. *dsRNA binding motif*, dsRBM), dsRBM1 i dsRBM2. Provedena je analiza (Stefl *et al.*, 2006.) dsRBM-a u interakciji sa mjestom R/G na mRNA za GluR-B (Slika 7.).



Slika 7. NMR model motiva dsRBM1 i dsRBM2 proteina ADAR2 u kompleksu s omčom R/G. dsRBM1 (crveno) stvara interakciju sa centralnim dijelom penta omče. Nasuprotno mjestu uređivanja nalaze se izvrnuti citozini s kojim u interakciju stupa dsRBM2 (zeleno) (Stefl *et al.*, 2006.).

Oba motiva su neophodna za rad proteina ADAR2 no djeluju neovisno. Između njih se nalazi vezujuća domena koja nema uređenu strukturu te ne sudjeluje u interakcijama dsRBM-a i mjesta R/G. Također dsRBM-i sami prepoznaju vezna mjesta, bez sudjelovanja katalitičke domene, a vezna mjesta su različita. Motiv dsRBM1 radije veže omču sa slijedom nukleotida GCUCA dok dsRBM2 radije veže duplekse RNA koji sadrže krivo sparene bazne parove,

najčešće A-C koji su česte mete deaminacije. Ukoliko je dsRBM2 nefunkcionalan, dsRBM1 može vezati duplekse sa krivo sparenim bazama, no efikasnost uređivanja opada što ukazuje na važnost vezanja dsRBM2 na nepravilne duplekse. Važnost dsRBM1 se očituje u povećanju afiniteta vezanja kompleksa za supstrat. Sekundarna struktura omče R/G je visoko konzervirana što ukazuje kako protein ADAR2 prepoznaje supstrat zbog njegove strukturne specifičnosti.

2.2.3 Protein ADAR3

Treći i zasad najmanje istraženi član obitelji proteina ADAR je protein ADAR3. Ima ograničenu distribuciju koja se svodi na područje mozga, točnije amigdalu i talamus. Sadrži dva dsRBM-a, deaminaznu domenu te R-domenu, bogatu lizinom i argininom. Sve navedene domene jesu strukturno i nukleotidnim slijedom veoma slični domenama proteina ADAR2. To ukazuje na bližu evolucijsku srodnost proteina ADAR2 i ADAR3 nego sa proteinom ADAR1. Iako je protein ADAR3 strukturno sposoban vršiti deaminaciju, proces uređivanja RNA ovim proteinom nije zabilježen. Unatoč tomu što deaminazna katalitička podjedinica nije aktivna, protein ADAR3 stupa u interakcije s dlRNA, no sa nešto manjim afinitetom nego proteini ADAR1 i ADAR2. Osim s dlRNA, tvori interakcije s jednolančanom RNA (engl. *single stranded RNA*, ssRNA) preko N-terminalne R-domene. Motivi jlRNA pronađeni su kod supstrata (npr. GluR-B and 5HT-_{2C}R) koji prolaze proces uređivanja. Protein ADAR3 djeluje inhibicijski na proteine ADAR1 i ADAR2 što može upućivati na moguću regulacijsku ulogu ovog proteina prilikom uređivanja (Chen *et al.*, 2000.).

3. Uređivanje mitohondrijske RNA kod praživotinja

3.1 Uređivanje mitohondrijske mRNA kinetoplastida

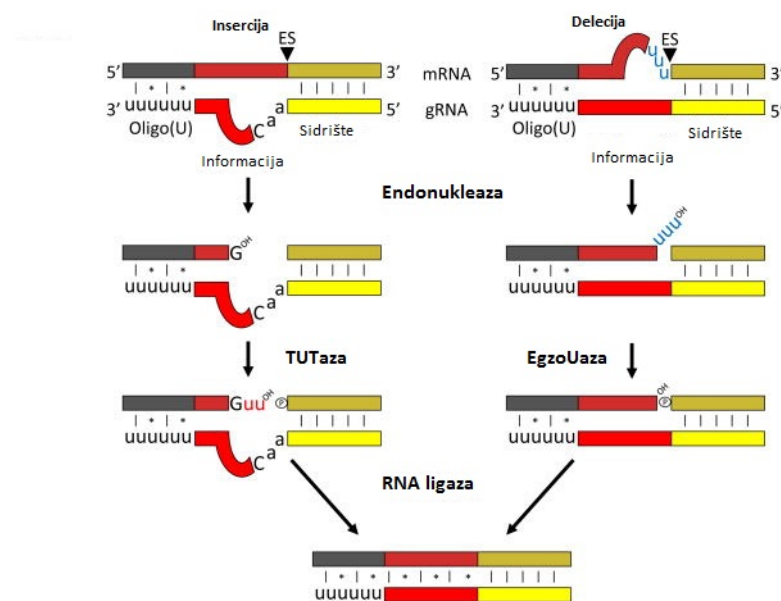
Kinetoplastidi su parazitska skupina jednostaničnih bičastih praživotinja koje sadrže kinetoplast – diskoidno tjelešce sastavljeno od kružnih DNA u mitohondriju pri bazi biča. Kinetoplastna DNA (kDNA) sastoji se od maksikružnica i minikružnica. Maksikružnice sadrže 18 gena koji kodiraju za proteine, većinom za podjedinice respiracijskog kompleksa mitohondrija. Od njih 18, 12 podliježe procesu uređivanja insercijom tj. delecijom uridina (U). Minikružnice kodiraju RNA-vodič (engl. *guide RNA*, gRNA) koja djeluje *in trans* te je neophodna za vršenje uređivanja RNA (Aphasizheva *et al.*, 2014.).

3.1.1 Osnovni mehanizam uređivanja RNA

Središnji kompleks za uređivanje RNA (engl. *RNA editing core complex*, RECC), u literaturi nazivan i kao 20S editosom prema brzini sedimentacije (Stuart *et al.*, 2005.), je proteinski kompleks koji obuhvaća enzimске aktivnosti potrebne za jedan krug uređivanja RNA. Uređivanje inicira gRNA komplementarno se sparujući s neuređenom mRNA (engl. *pre-edited mRNA*, pre-mRNA). Na mjesto uređivanja (engl. *editing site*, ES) ukazuje prvi krivo spareni bazni par između gRNA i pre-mRNA. ES zatim cijepa endonukleaza te nastaju 5'→3' fragmen i povezani pomoću gRNA. Zatim se dodaju uridini s 5'-fragmenta pomoću 3'-terminalne uridiltransferaze (engl. *3'-terminal uridylyltransferase*, TUT) ili uklanjaju pomoću egzonukleaze. Nakon toga RNA ligaza kompleksa RECC spaja krajeve. Svi spomenuti enzimi priradaju proteinskom kompleksu RECC. Ovaj osnovni mehanizam uređivanja je prikazan na Slici 8. (Hashimi *et al.*, 2013.).

Sljedeći ključni proteinski kompleks je kompleks koji vezuje mitohondrijsku RNA 1 (engl. *mitochondrial RNA binding 1*, MRB1). Za razliku od RECC on je dinamičan te sadrži šest glavnih proteina: GAP1 i GAP2 (engl. *gRNA associated proteins* – proteini pridruženi gRNA) te proteine MRB11870, MRB2010, MRB5390 i MRB8620, koji se udružuju neovisno o RNA (Ammerman *et al.*, 2013.). Proteini GAP1/2 djeluju kao heterotetrameri, stupaju u interakcije s gRNA te je njihova ključna uloga u stabilizaciji i prenošenju gRNA do središnjeg kompleksa. Osim navedenih proteina, u sastav kompleksa MRB1 često ulazi i protein TbRGG2. Njegovo utišavanje dovodi do poremećaja prilikom inicijacije uređivanja RNA jer favorizira interakciju s pre-mRNA. Protein MRB10130 se također može detektirati u kompleksu MRB1. Stupa u slabe interakcije sa više komponenata kompleksa, dok s

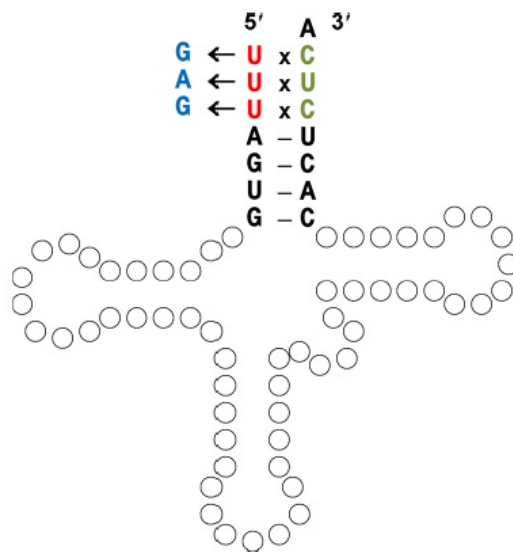
proteinom TbRGG2 stvara jake interakcije. Spada u skupinu Armadillo proteina koji često djeluju kao organizatori multiproteinskih kompleksa, te je predložena njegova uloga u organiziranju interakcija između kompleksa MBR1 i proteina TbRGG2 (Ammerman *et al.*, 2013.). Kao glavne funkcije kompleksa MBR1 stoga možemo navesti sljedeće: (1) djelovanje zajedno sa kompleksom RECC u cjelokupnom procesiranju RNA, gdje GAP-ovi mogu služiti u stabilizaciji gRNA u reakcijskom centru dok protein TbRGG2 pomaže odmatanju gRNA-mRNA dupleksa i (2) uloga u povezivanju kRNA s drugim procesima koji sudjeluju u ekspresiji mitohondrijskih gena (Hashimi *et al.*, 2013.).



Slika 8. Osnovni mehanizam uređivanja RNA kod kinetoplastida kompleksom RECC. ES određuje prvi krivo spareni par dupleksa gRNA-mRNA. Žuta boja na gRNA označava sidrišni dio, crvena dio koji nosi informaciju te crni 3'-oligo(U) rep. Odgovarajuće regije na mRNA su označene drugim nijansama istih boja. ES cijepa endonukleaza (enzimske aktivnosti su crno podebljane). Kod insercije, TUT-aza navođena s gRNA dodaje U (crveno) na 3'-kraj 5'-fragmenta. Tijekom delecije U specifična egzonukleaza (egzoU-aza) uklanja U s 3'-kraja 5'-fragmenta. Ligaza potom spaja fragmente mRNA (Hashimi *et al.*, 2013.).

4. Uređivanje mitohondrijske tRNA kod amebe *Acanthamoeba*

Acanthamoeba castellanii, ameboidna praživotinja, jedan je od prvih organizama na kojima je proučavano uređivanje mitohondrijske tRNA. U mitohondriju se nalazi 15 tRNA od kojih 12 ima krivo sparene bazne parove te prolaze proces uređivanja. Nukleotidi koji bi stvarali krivo sparene bazne parove nalaze se najčešće na jednom, ili više, od prva tri nukleotida na 5'-kraju akceptorske petlje (Slika 9.) (Gray, 2012.).



Slika 9. Mitohondrijska tRNA^{Asp} *A.castellanii* s 5'-krajem koji prolazi proces uređivanja. Komplementarno sparivanje je označeno crticom (-), a krivo spareni bazni parovi X-om. Uređivanjem je potrebno ukloniti prva tri nukleotida na 5'-kraju (crveno) te ih zamijeniti nukleotidima (plavo) koji bi tvorili standardne, Watson-Crickove, bazne parove sa unutarnjim nukleotidima 3'-kraja (zeleno) akceptorske petlje (Gray, 2012.).

Akceptorska petlja je važna u formaciji tercijarne strukture tRNA što može bitno utjecati na prepoznavanje tRNA od strane aminoacil-tRNA-sintetaze. Nukleotidi u ovom slučaju najvjerojatnije nisu modifikacije postojećih nukleotida već zamjena zato što može doći i do promjena purina u pirimidine (npr. G→C, A→U). Jedan od modela predlaže da 3'-kraj akceptorske petlje služi kao predložak za uređivanje, dok se nukleotidi s 5'-strane izrezuju i zamjenjuju. U tom procesu bili bi potrebni enzimi 5'→3' endo- i egzonukleaze radi izrezivanja nukleotida, 3'→5' nukleotidiltransferazna aktivnost u svrhu zamjene te 5'→3' RNA polimeraza koja će komplementarno spariti nove bazne parove (Pierce i Gray, 2012.).

5. Uređivanja RNA kod biljaka

Uređivanje RNA kod biljaka odvija se u mitohondrijima i plastidima te je najčešća modifikacija C→U kod kopnenih biljaka (Yagi *et al.*, 2013.). Proces većinom zahvaća regije mRNA koje kodiraju proteine, što dovodi do promjena aminokiselinskog slijeda, dok u nešto manjoj mjeri intronske sekvence, molekule tRNA te nekodirajuće RNA (Gray, 2012.). Proteini s trikopeptidnim penta ponavljajućim sljedovima (engl. *pentatricopeptide repeat*, PPR) obnašaju glavnu ulogu uređivanja RNA kod biljaka, najvjerojatnije u prepoznavanju ES (Hayes *et al.*, 2013.). Kodirani su genima jezgre koji broje više od 400 članova kod cvjetnjača. Mogu se svrstati u dvije skupine, P i PLS. P označava ponavljajući motiv koji sadrži 35 aminokiselina dok PLS sadrži različite varijante ponavljajućeg slijeda od 35 aminokiselina, P motiv te L (long – dugi) i S (short – kratki) varijante (Lurin *et al.*, 2004.). Na C-terminalnom kraju skupine PLS nalazi se domena E (extended – produžena) nakon koje se može nalaziti i domena DYW (D-aspartat, Y-tirozin, W-triptofan) nazvana zbog ponavljajućeg tripeptida na kraju. Iako domena DYW sadrži strukturne karakteristike citidinske deaminaze, njena aktivnost kao takva nije potvrđena. Također postojanje domene DYW u pozitivnoj je korelaciji sa stopom uređivanja RNA u biljaka, ali nije neophodna (Schallenberg-Rüdinger *et al.*, 2013.). Osim PPR proteina, skupina višestrukih organelnih faktora uređivanja RNA (engl. *multiple organellar RNA editing factor*, MORF) potrebna je za uređivanje RNA plastida i mitohondrija. Gubitak proteina MORF dovodi do djelomičnog ili potpunog zaustavljanja uređivanja. Najvjerojatnije stvaraju komplekse zajedno s proteinima PPR te je ta interakcija specifična za kopnene biljke (proteina sličnih MORF-u nema u ostalim skupinama organizama). Veća mogućnost stvaranja kompleksa je povezana s više mogućih ES. Također je uočeno kako su ti kompleksi stabilniji u plastidima nego u mitohondrijima. Uzrok tomu je vjerojatno potrebna brža adaptacija mitohondrija na nove uvjete uređenja RNA (Takenaka *et al.*, 2012.).

6. Uređivanje RNA kod virusa

Neke vrste RNA-virusa tijekom transkripcije u vlastitu mRNA ugrađuju dodatne nukleotide. Njihove RNA jesu *antisense* tj. nekodirajući lanac RNA, komplementaran staničnoj mRNA. Prepisuju se virusnom RNA-ovisnom RNA-polimerazom koja tijekom rada pauzira i zastaje što omogućuje dodavanje nukleotida (Brennicke et al, 1998.).

Filovirusi, ebolavirusi (EBOV) i marburgvirusi (MARV) uzrokuju tešku hemoragičnu groznicu kod svih primata, uključujući i ljude. Jednolančana *antisense* RNA koja sadrži sedam gena za sedam strukturnih proteina koji je njihov genetski materijal (Mehedi *et al.*, 2013.). Transmembranski glikoprotein (GP) koji sudjeluje u inicijaciji infekcije, dopuštajući ispuštanje nukleokapsidnog sadržaja virusa u citoplazmu domaćinske stanice, podliježe procesu uređivanja RNA samo kod EBOV (Volchkova *et al.*, 2011.). Uređivanje se odvija na ES, koje sadrži sedam U za redom, dodavanjem adenozinjskih ostataka bez predloška. Ribonukleoproteinski kompleks koji sudjeluje u procesu kodiran je virusnim genomom. To dovodi do promjene okvira čitanja mRNA za GP koji spaja dva preklapajuća okvira čitanja. Nastaju duži transkript koji kodira za GP i transkript za mali topljivi GP. Ukoliko se ukloni ES dolazi do povećane patogenosti u usporedbi na divlji tip EBOV. Stoga uloga uređivanja RNA GP je vjerojatno regulacija ekspresije te sprječavanje preuranjene citotoksičnosti (Mehedi *et al.*, 2013.).

Virus hepatitisa delta (HDV) može uzrokovati akutni ili kronični hepatitis kod ljudi. HDV-u je potrebna pomoć virusa hepatitisa B (HBV) kako bi mogao složiti omotač, vezati se na stanice jetre koje inficira, te otpustiti čestice HDV virusa. Ima zasad najmanji poznati genom infektivan za čovjeka od samo 1700 nukleotida. RNA genom kodira za samo jedan protein, hepatitis delta antigen (HDAg), koji dolazi u dvije forme HDAg-S i HDAg-L. Stoga replikacija HDV jako ovisi o proteinima domaćina, te je osjetljiva na omjer koncentracije S i L oblika HFAg. Uređivanje RNA se odvija prilikom replikacije na mjestu amber stop kodona (UAG), gdje dolazi do deaminacije A→I, te kodon kodira za triptofan (W). To dovodi do promjene te umjesto prvotnog HDAg-S, potrebnog za replikaciju, nastaje HDAg-L koji može inhibirati replikaciju. Mjesto uređivanja se naziva mjesto amber/W, a enzimi koji mogu vršiti deaminaciju jesu domaćinovi proteini ADAR1 i ADAR2 (detaljnije u poglavlju 2.2). Veća vjerojatnost je da protein ADAR1 uređuje HDV RNA prilikom infekcije jer je utvrđena veća stopa njegove ekspresije tada. Također, konstitutivno eksprimirni oblik proteina ADAR1, ujedno obilnija u jetri, ima veći afinitet za amber/W mjesto nego oblik induciran INF. Ovo

područje je zanimljivo za daljnja istraživanja osobito u svrhu liječenja pomoću IFN, za koji je pokazano da može utjecati na smanjenje ekspresije HDaG (Casey, 2013.).

7. Model neutralne konstruktivne evolucije

U prethodnim poglavljima navedeni su važniji primjeri uređivanja RNA u raznim domenama života. Kao što se može vidjeti izvedba tih procesa je različita na genetičkoj, biokemijskoj i filogenetičkoj razini. Stoga uređivanje RNA ne može biti posljedica evolucije iz progenitorskog organizma, već svojstvo određenih razvojnih linija. Svaki oblik uređivanja RNA je izuzetno kompleksan i energetski skup proces te za nastajanje i adaptaciju istog u različitim organizmima moraju postojati čvrsti temelji. Iako se ne može sa sigurnošću tvrditi zašto je nastao, model takozvane neutralne konstruktivne evolucije (engl. *constructive neutral evolution*, CNE) pokušava kroz zajedničke karakteristike uređujućih sustava RNA približiti se tom pitanju. CNE opisuje evoluciju sustava RNA, bez pozitivne selekcije, nakon što funkcionalni stanični element usvoji mutaciju osloni se na već postojeće komponente ili procese što uzrokuje veću međuovisnost komponenti a tako i kompleksnost samog sustava. Navodi koji podupiru tu teoriju jesu sljedeći. Sustavi uređivanja RNA se pojavljuju prije same potrebe za uređivanjem, pri čemu sudjeluju proteini sa već postojećom ulogom u stanici. Sustav za uređivanje RNA preuzima na sebe ulogu rješavanja potencijalno štetnih mutacija. Ako mutacija ima jako malo ili nisu od velike važnosti sustav uređivanja RNA može nestati, a one se popraviti na razini gena, tj. DNA. Sustav postane neophodan ukoliko vjerojatnost popravka pogubnih mutacija na razini gena postane vrlo mala. Mjesto uređivanja se može razmotriti kao štetne mutacije. Stoga, ukoliko se pojave nova mjesta uređivanja u dovoljnom broju sustav uređivanja RNA se može oformiti. Suprotno, ako već postojeći sustav uređivanja RNA nema dovoljno ES on može postupno nestati.

Zaključno, sustavi uređivanja RNA, prema CNS modelu, nastaju nakon mutacije kako bi postupno dopustili genetičkoj informaciji u DNA postupnu degeneraciju tj. preuzeli dio uloga DNA na sebe.

Zaključak je izveden na temelju publikacije Michaela W. Graya, *Evolutionary Origin of RNA Editing*.

8. Literatura

- Ammerman M. L., Tomasello D. L., Faktorova D., Kafkova L., Hashimi H., Lukeš J. and Read L. K., A Core MRB1 Complex Component Is Indispensable for RNA Editing in Insect and Human Infective Stages of *Trypanosoma brucei*, PLoS One. (2013); 8(10): e78015.
- Aphasizheva I., Zhang L., Wang X., Kaake R. M., Huangm L., Monti S. and Aphasizhev R., RNA Binding and Core Complexes Constitute the U-Insertion/Deletion Editosome, Mol Cell Biol. (2014); 34(23): 4329–4342.
- Bahn J. H., Ahn J., Lin X., Zhang Q., Lee J. H., Civelek M. and Xiao X., Genomic Analysis of ADAR1 Binding and its Involvement in Multiple RNA Processing Pathways, Nat Commun. (2015); 6: 6355.
- Barraud P. and Allain F. H.-T, ADAR Proteins: Double-stranded RNA and Z-DNA Binding Domains, Curr Top Microbiol Immunol. (2012); 353: 35–60.
- Brennicke A., Marchfelder A. and Binder S., RNA editing, FEMS Microbiology Reviews 23 (1999) 297-316.
- Casey J. L., Hepatitis Delta Virus RNA Editing, Madame Curie Bioscience Database [Internet], Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.
- Chen C.-X., Cho D.-S. C., Wang Q., Lai F., Carter K. C. and Nishikura K., A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double- stranded RNA binding domains, RNA (2000), 6:755–767.
- Degnan L. F. and Degnan B. M., The origin of the ADAR gene family and animal RNA editing, BMC Evol Biol. (2015); 15(1): 4.
- Feng Y., Sansam C. L., Singh M. and Emeson R.B., Altered RNA Editing in Mice Lacking ADAR2 Autoregulation, Mol Cell Biol. (2006); 26(2): 480–488.
- Gray M. W., Evolutionary Origin of RNA Editing, Biochemistry (2012), 51, 5235–5242.
- Hashimi H., Zimmer S. L., Ammerman M. L., Read L. K. and Lukeš J., Dual core processing: MRB1 is an emerging kinetoplast RNA editing complex, Trends Parasitol. (2013); 29(2): 91–99.
- Hayes M. L., Giang K., Berhane B. and Mulligan R. M., Identification of Two Pentatricopeptide Repeat Genes Required for RNA Editing and Zinc Binding by C-terminal Cytidine Deaminase-like Domains, J Biol Chem. (2013); 288(51): 36519–36529.
- Jepson J. E. C. and Reenan R. A., RNA editing in regulating gene expression in the brain, Biochimica et Biophysica Acta 1779 (2008) 459–470.
- Koito A. and Ikeda T., Intrinsic restriction activity by AID/APOBEC family of enzymes against the mobility of retroelements, Mob Genet Elements. (2011); 1(3): 197–202.

Lurin C., Andres C., Auburg S., Bellaoui M., Bitton F., Bruyere C., Caboche M., Debast C., Gualberto J., Hoffman B., Lecharny A., Le Ret M., Martin-Magiette M.-L., Mireau H., Peeters N., Renou J.-P., Szurek B., Taconnat L. and Small I., Genome- Wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveal Their Essential Role in Organelle Biogenesis, *Plant Cell*. (2004); 16(8): 2089–2103.

Maas S. and Gommans W. M., Novel Exon of Mammalian ADAR2 Extends Open Reading Frame, *PLoS ONE*. (2009); 4(1): e4225.

Mehedi M., Hoenen T., Robertson S., Ricklefs S., Dolan M. A., Taylor T., Falzarano D., Ebihara H., Porcella S. F. and Feldmann H., Ebola Virus RNA Editing Depends on the Primary Editing Site Sequence and an Upstream Secondary Structure, *PLoS Pathog*. (2013); 9(10): e1003677.

Mukhopadhyay D., Anant S., Lee R. M., Kennedy S., Viskochil D. and Davidson N. O., C→U Editing of Neurofibromatosis 1 mRNA Occurs in Tumors That Express Both the Type II Transcript and apobec-1, the Catalytic Subunit of the Apolipoprotein B mRNA-Editing Enzyme, *Am J Hum Genet*. (2002); 70(1): 38–50.

Nelson D. L. and Cox M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth Edition, Macmillan Higher Education, International Edition

Nigita G., Veneziano D. and Ferro A., A-to-I RNA Editing: Current Knowledge Sources and Computational Approaches with Special Emphasis on Non-Coding RNA Molecules, *Front Bioeng Biotechnol*. (2015) 25;3:37.

Nishikura K., Functions and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases, *Annu Rev Biochem*. 2010; 79: 321–349.

Pierce D. H. and Gray M. W., A novel nucleotide incorporation activity implicated in the editing of mitochondrial transfer RNAs in *Acanthamoeba castellanii*, *RNA* (1999); 5:302-317.

Prohaska K. M., Bennet R. P., Salter J. D. and Smith H. C., The multifaceted roles of RNA binding in APOBEC cytidine deaminase functions, *Wiley Interdiscip Rev RNA*. (2014) ;5(4):493-508.

Samuel C. E., Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs) are both Antiviral and Proviral Dependent upon the Virus, *Virology*. (2011); 411(2): 180–193.

Saraconi G., Severi F., Sala C., Mattiuz G. and Conticello S. G., The RNA editing enzyme APOBEC1 induces somatic mutations and a compatible mutational signature is present in esophageal adenocarcinomas, *Genome Biol*. (2014) ;15(7):417.

Schallenberg-Rudinger M., Lenz H., Polsakiewicz M., Gott J. M. and Knoop V., A survey of PPR proteins identifies DWY domains like those of land plant RNA editing factors in diverse eukaryotes, *RNA Biol*. (2013); 10(9): 1549–1556.

Sharma S., Patnaik S. K., Thomas Taggart R., Kannisto E. D., Enriquez S. M., Gollnick P. and Baysal B. E., APOBEC3A cytidine deaminase induces RNA editing in monocytes and macrophages, *Nat Commun*. (2015); 6: 6881.

Smith H. C., Bennett R. P., Kizilyer A., McDougall W. M. and Prohaska K. M., Functions and regulation of the APOBEC family of proteins, *Semin Cell Dev Biol*. (2012) ;23(3):258-68.

Stefl R., Xu M., Skrisovska L., Emeson R. B. and Allain F. H.-T., Structure and Specific RNA Binding of ADAR2 Double-Stranded RNA Binding Motifs, *Structure* (2006); 14, 345–355.

Stuart K. D., Schnauffer A., Lewis Ernst N. and Panigrahi A. K., Complex management: RNA editing in trypanosomes, *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.30 No.2 F (2005).

Takenaka M., Zehrmann A., Verbitskiy D., Kugelman M., Hartel B. and Brennicke A., Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2012); 109(13): 5104–5109.

Volchkova V. A., Dolnik O., Martinez M. J, Reynard O., Volchkov V. E., Genomic RNA editing and its impact on Ebola virus adaptation during serial passages in cell culture and infection of guinea pigs, *J Infect Dis.* (2011);204 Suppl 3:S941-6.

Wright A. and Vissel B., The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain, *Front Mol Neurosci.* (2012); 5: 34.

Yagi Y., Tachikawa M., Noguchi H., Satoh S., Obokata J. and Nakamura T., Pentatricopeptide repeat proteins involved in plant organellar RNA editing, *RNA Biol.* (2013); 10(9): 1419–1425.

Sažetak

Uređivanje RNA opisuje molekularne procese koji uključuju post-transkripcijsku promjenu nukleotida molekule RNA u odnosu na kodirajuću DNA što je često nužno za uspostavljanje biološke funkcije. Odvija se u svim domenama života osim kod prokariota, te kod nekih RNA-virusa. Uređivanjem su zahvaćeni jezgrini, mitohondrijski te plastidni transkripti RNA, a uređivana RNA ne mora nužno kodirati za proteine. Uređivanje RNA se može svrstati u dvije skupine – supstitucijsko, u kojem dolazi do zamjene nukleotida te insercijsko ili delecijско koje mijenja broj nukleotida u uređivanom transkriptu. Glavni predstavnici supstitucijskih uređivanja kod sisavaca jesu proteinski kompleksi APOBEC i ADAR. Protein APOBEC je citidinska deaminaza te provodi deaminaciju C→U, dok je protein ADAR adenozińska deaminaza te mijenja A→I. Kod praživotinja uređuje se mitohondrijska RNA. Za *Trypanosoma* karakteristična je insercija tj. delecija uridina kod gena koji kodiraju za proteine. Kod amebe *Acanthamoeba castellanii* se uređuje molekula tRNA na 5'-kraju akceptorske petlje. Uređivanje kod biljaka najčešće se odnosi na modifikaciju C→U koja se odvija na mitohondrijskim i plastidnim transkriptima. RNA-virusi kao Ebolavirus i virus hepatitisa delta također bivaju podvrgnuti uređivanju RNA, pomoću vlastitih ili domaćinskih proteina, što ima značajan utjecaj na njihovu virulentnost. Uređivanje RNA je vrlo kompleksan i energetski skup proces te se postavlja pitanje kako je uopće došlo do njegove široke rasprostranjenosti. Model neutralne konstruktivne evolucije pokušava dati zadovoljavajući odgovor na to pitanje gledajući na postojanje sustava uređivanja RNA kao na sustav koji preuzima dio odgovornosti u procesu ispravljanja grešaka u DNA. Pri tome se štetne mutacije ispravljaju ne na razini DNA, već na razini RNA.

Summary

RNA editing describes molecular processes that include posttranscriptional changes in RNA nucleotide sequence compared to coding DNA sequence and may be necessary for their biological function. It is spread in eukaryotes, and it also occurs in some RNA viruses. Nucleus, mitochondria and plastids are cellular compartments in which RNA editing occurs. Also transcripts to be edited are not necessarily protein coding. There are two main groups of RNA editing – editing by substitution of nucleotides and insertions or deletions in which number of nucleotides in RNA transcripts is changed. For substitution editing, there are two main protein systems in mammals – APOBEC and ADAR. APOBEC has cytidine deaminase activity and conducts C to U deamination whereas ADARs are adenosine deaminases and they change A→I. Protozan RNA editing includes editing of mitochondrial RNA transcripts. Typical editing for trypanosomatid protozoans involves insertion as well as deletion of U in protein coding RNA transcripts. RNA editing in protozoa *Acanthamoeba castellanii* includes editing of 5'-end of tRNA acceptor stem. In plants C to U editing is the most common type of modification. Mitochondrial and plastids RNAs are targeted for editing in this case. RNA of viruses, like Ebolavirus and hepatitis delta virus, can also undergo editing using its own or host protein complexes. It can largely affect their virulence. RNA editing is complex and energetically expensive process so there is open question why did it even arose. Constructive neutral evolution model tries to give satisfying answer. It proposes that RNA editing system emerged after allowing mutations to happen. RNA editing allows corrections of DNA mutations on RNA level and therefore it permits DNA-encoded information to degenerate progressively.